

Über die energetische Kopplung der Nitritassimilation von Grünalgen an Atmung und Photosynthese

von

Anton Hofmann

aus

Turn

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548820_0067

Über die energetische Kopplung der Nitritassimilation von Grünalgen an Atmung und Photosynthese

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Anton Hofmann
aus
Turn

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.



Tag der mündlichen Prüfung: 11. 11. 1970

Dekan: Prof. Dr. W. Jaenicke

Erstberichterstatter: Prof. Dr. E. Kessler

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. W. Haupt

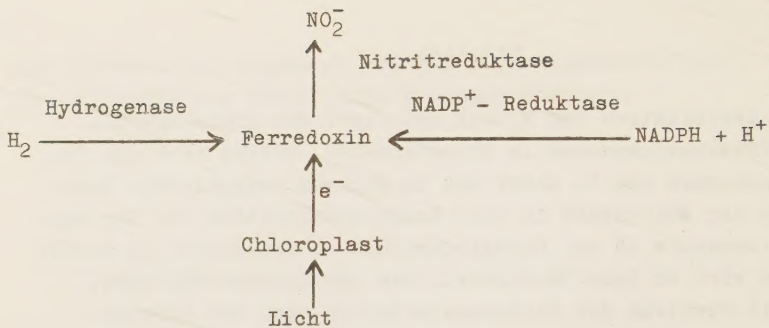
Einleitung

Die Assimilation von Nitrat ist einer der grundlegenden Stoffwechselprozesse im Pflanzenreich. Nitrat wird als Ion aufgenommen und im Licht und im Dunkeln assimiliert. Dabei wird der Stickstoff in vier Reaktionsschritten von der Oxydationsstufe +5 zur Oxydationsstufe -3 reduziert. In dieser Form wird er dann Bestandteil der organischen Substanz.

Die Probleme der Nitratassimilation sind bei höheren Pflanzen, Grünalgen, Pilzen und Bakterien eingehend bearbeitet worden (vgl. Kessler, 1964; Beevers u. Hageman, 1969). Dabei konnte der erste Teilschritt der Nitratassimilation weitgehend aufgeklärt werden. Nitrat wird von der pflanzlichen Zelle zu Nitrit reduziert, das als erstes Zwischenprodukt einwandfrei nachgewiesen wurde (Kessler, 1953, 1955).

Über den weiteren Verlauf der Nitratassimilation und die dabei auftretenden Zwischenprodukte herrscht jedoch noch Unklarheit. Diskutiert wird die Möglichkeit, daß Nitrit über Hydroxylamin zu Ammoniak reduziert und das NH_3 anschließend in organische Substanz eingebaut wird. Demnach wäre NH_2OH ein physiologisches Zwischenprodukt der Assimilation von Nitrit. Die Untersuchungsergebnisse über die Reduktion des Hydroxylamins sind aber - nicht zuletzt wegen der Instabilität und Reaktionsfreudigkeit dieser Verbindung - ziemlich heterogen (vgl. Czygan, 1965). Czygan schlägt eine zweite Möglichkeit der Nitritassimilation vor: Entweder wird Nitrit direkt an einen organischen Akzeptor gebunden und dann erst reduziert, oder es erfolgt die Reduktion des Nitrits zu Hydroxylamin, und dieses wird dann in organische Bindung übergeführt und in dieser weiter reduziert zur Aminogruppe. In diesen Fällen wäre NH_3 nicht Endprodukt der Nitritassimilation.

Losada et al. (1963) sowie Paneque et al. (1964) schlagen folgendes Schema der assimilatorischen Nitritreduktion vor:



Reduziertes Ferredoxin überträgt mit Hilfe des konstitutiven Enzyms Nitritreduktase 6 Elektronen auf Nitrit, das dabei ohne Zwischenprodukte bis zum NH_3 reduziert wird. Die Elektronen zur Reduktion des Ferredoxins können aus drei Quellen stammen:

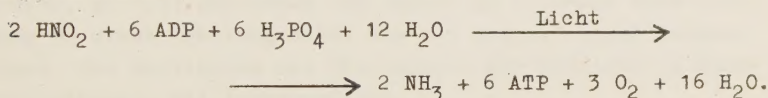
1. Molekularer Wasserstoff (H_2) wird nach anaerober Dunkelinkubation durch das Wasserstoff aktivierende Enzym Hydrogenase aktiviert und dient zur Reduktion des Ferredoxins.
2. Im Verlauf der photosynthetischen Primärprozesse im Chloroplasten werden aus dem durch Lichtabsorption angeregten Chlorophyll Elektronen auf das Ferredoxin übertragen.
3. Durch Dehydrierungsvorgänge des Atmungsstoffwechsels gebildetes NADPH wird mit Hilfe des Enzyms NADP⁺- Reduktase oxydiert und überträgt Elektronen in einer Dunkelreaktion auf das Ferredoxin.

Auf die Beziehungen zwischen der Nitrataassimilation im Dunkeln und der Atmung bei der Grünalge *Ankistrodesmus braunii* wies Kessler (1953) hin. Er zeigte, daß bei durch Anaerobiose verhaltener Atmung die Dunkelassimilation von Nitrit bedeutend stärker gehemmt ist als die Dunkelreduktion von Nitrat zu Nitrit. Die Annahme, zur Assimilation des Nitrats sei - neben Elektronendonatoren - energiereiches Phosphat (ATP) aus dem Atmungsstoffwechsel notwendig, fand eine Stütze in folgendem Befund: Die Dunkelassimilation von Nitrit wird sehr stark durch das Phosphorylierungsgift 2,4-Dinitrophenol (DNP) gehemmt (Kessler, 1955). DNP hemmt aber auch die photo-

synthetische Nitritassimilation, bei der die Elektronendonatoren photosynthetischen Primärprozessen entstammen (Kessler, 1957 a; Hattori, 1962).

Gegen diese Deutung der DNP-Hemmwirkung auf die Nitritassimilation wurden aber von mehreren Seiten Einwände erhoben (Nason u. Takahashi, 1958; Ramirez et al., 1966; Del Campo et al., 1966; Ahmad u. Morris, 1967). Die blockierende Wirkung des DNP sollte dadurch zustande kommen, daß DNP anstelle von Nitrit reduziert wird und daher Reduktionsäquivalente verbraucht, die sonst der Nitritreduktion zur Verfügung ständen. Del Campo et al. (1966) sowie Wessels (1965) beschreiben zwar die Reduktion von DNP durch belichtete Chloroplasten-Systeme, aber einer möglichen Konkurrenz zwischen DNP und Nitrit um die Elektronendonatoren der Zelle und einer dadurch bedingten Hemmung der Nitritassimilation widerspricht ein weiterer Befund: Das Phosphorylierungsgift Arsenat hemmt ebenfalls die assimilatorische Nitritreduktion (Kessler u. Bucker, 1960).

Ein weiterer Einwand gegen Kesslers Deutung der ATP-Abhängigkeit der Nitritassimilation wurde von Losada et al. (1963) sowie von Paneque et al. (1964) erhoben. Bei ihren Untersuchungen über das für die assimilatorische Nitritreduktion notwendige Enzym Nitritreduktase konnten sie keine Hemmung von DNP auf die Reduktion von Nitrit in vitro feststellen. Diese Autoren betrachten die photosynthetische Nitritreduktion nämlich als einen Vorgang, der analog der nicht-zyklischen Photophosphorylierung nach folgender summarischen Gleichung abläuft:



Nitrit dient in diesem Falle als Elektronenakzeptor und ersetzt NADP^+ , das bei der nicht-zyklischen Photophosphorylierung die Elektronen aufnimmt. Bei dieser photosynthetischen Nitritreduktion in vitro wird in stöchiometrischem Verhältnis ATP gebildet.

Aus den angeführten Befunden geht hervor, daß das Problem der energetischen Kopplung der Nitritassimilation an exergo-

nische Stoffwechselprozesse noch immer seiner Klärung harrt. Wenn jedoch die These einer ATP-Abhängigkeit der Nitritassimilation Gültigkeit besitzt, sollten sich Veränderungen des ATP-Pools der Zellen auf die Intensität der Nitritassimilation auswirken. Solche Veränderungen sind auf mehreren Wegen möglich:

1. Durch entkoppelnde Agentien kann der Wirkungsgrad der Phosphorylierungsprozesse herabgesetzt werden.
2. Die Steigerung der Atmung durch Zusatz von Atmungssubstrat oder die Hemmung der Atmung durch Anaerobiose verändert den durch die respiratorische Phosphorylierung erzeugten Vorrat an ATP.
3. Endergonische Stoffwechselprozesse verringern den ATP-Pool der Zellen.

Unter Ausnutzung dieser Möglichkeiten soll in dieser Arbeit versucht werden, eine Antwort auf die Frage nach der energetischen Kopplung der Nitritassimilation an die energieliefernden Stoffwechselvorgänge der Atmung und der Photosynthese zu erhalten.

Material und Methodik

Versuchsmaterial. Die meisten Untersuchungen wurden mit dem Marburger Stamm von *Ankistrodesmus braunii* (Nägeli) Collins (Sammlung Pringsheim, Göttingen, Nr. 202 - 7c) durchgeführt. Zu einigen Versuchen wurden auch *Chlorella vulgaris* Beijerinck (211 - 8m) und *Chlorella fusca* Shihira et Krauss (211 - 8b) herangezogen.

Anzucht der Algen. Die Anzucht erfolgte im Medium nach Kessler u. Czygan (1970) im Dauerlicht (4000 Lux) bei 25° C in modifizierten Erlenmeyer-Kolben unter Belüftung mit steriler Luft, die 2 % CO₂ enthielt. Auf diese Art angezogene Algen werden als Normalalgen bezeichnet.

Zur Anzucht von P-Mangelkulturen wurde eine Nährlösung verwendet, die nur 1/100 der zur Anzucht der Normalalgen verwendeten Phosphat-Konzentration enthielt. Als Puffersubstanz wurden in diesem Falle 10⁻² Mol NaHCO₃ pro Liter zugesetzt.

K-Mangelalgen wurden in einem Medium kultiviert, bei dem das KNO₃ völlig durch eine äquimolare Menge NaNO₃ ersetzt war. Ein geringer Gehalt an K⁺ wurde durch Zusatz von 2 x 10⁻⁵ Mol KCl pro Liter erreicht.

Die in einigen Fällen benötigte N-freie Nährlösung enthielt statt KNO₃ die äquimolare Menge KCl.

Versuchssuspensionen. 6 - 8 Tage alte Kulturen wurden abzentrifugiert, zweimal auf der Zentrifuge mit dem zum Versuch verwendeten Suspensionsmedium (meist 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5) gewaschen und danach in frischer Versuchslösung zu einem Trockengewicht von 0,5 bis 0,8 mg/ml suspendiert. Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgte in Glasfiltertiegeln mit Asbestauflage.

Reagentien zur Bestimmung von Nitrit und NH₃. Zur colorimetrischen Bestimmung von Nitrit wurde Illosvays Reagens verwendet. Dieses enthielt in einem Liter 2 M Essigsäure 2,0 g Sulfanilsäure und 0,4 g α -Naphthylamin gelöst und wurde in einer braunen Flasche luftdicht verschlossen aufbewahrt.

Die colorimetrische Bestimmung von NH₃ erfolgte mit Hilfe von Nessler's Reagens. Dieses enthielt in 100 ml Lösung

4,78 g HgJ_2 , 3,49 g KJ und 19,30 g KOH. Nessler's Reagens wurde bei etwa 5°C in einer braunen Flasche aufbewahrt.

Hemmstofflösungen und übrige Reagentien. 2,4-Dinitrophenol (DNF; Merck AG, Darmstadt), Pentachlorphenol (PCP; Fluka AG, Buchs/Schweiz) und Carbonylcyanid-m-chlorphenyl-hydraxon (CCCP; K&K Laboratories, Inc., Plainview, N.Y., Hollywood, Calif.) wurden in verdünnter NaOH gelöst und der gewünschte pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure eingestellt.

Arsenat (Merck AG, Darmstadt), Jodacetamid (JAA; Serva, Heidelberg), NaHCO_3 und Glucose wurden in wäßriger Lösung verwendet, die mit verdünnter Schwefelsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wurde.

3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU; Serva, Heidelberg) wurde in wenig Äthanol gelöst und dann mit Wasser zur erforderlichen Konzentration verdünnt.

N,N'-Disalicyliden-1,3-diaminopropan (DSPD; Fluka AG, Buchs/Schweiz) wurde in äthanolischer Lösung verwendet.

Methylviologen (Serva, Heidelberg) kam in wäßriger Lösung zur Anwendung.

Messung der Dunkelassimilation. Je 2,0 ml der Versuchssuspension wurden 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit 0,2 ml der zu prüfenden Hemmstofflösung versetzt. Die Kontrollgefäße erhielten anstelle der Hemmstoffe das entsprechende Lösungsmittel. Zu Versuchsbeginn wurden 0,2 ml NaNO_2 -Lösung ($1,2 \times 10^{-3} \text{ M}$) zugetropft und sofort umgeschüttelt. Nach einer Versuchsdauer von 2 Stunden bei Zimmertemperatur wurde durch Zufügen von 6 ml Ilosvays Reagens die Dunkelassimilation gestoppt. Danach wurde gut umgeschüttelt und zweimal abzentrifugiert. Die Extinktion des gebildeten roten Azofarbstoffs wurde etwa 20 Minuten nach Zugabe von Ilosvays Reagens im Spektralphotometer PMQ II in 1-cm-Küvetten bei 540 nm gegen Wasser gemessen. Durch Vergleich mit einer Eichkurve wurde die Nitritkonzentration ermittelt. Erfast wurde der Bereich von 2×10^{-6} bis $1 \times 10^{-4} \text{ Mol Nitrit pro Liter}$.

Messung der Lichtassimilation. Die Messung der Lichtassimilation wurde im Warburg-Thermostaten der Fa. Braun, Melsungen, durchgeführt. Je 4,0 ml der Versuchssuspension wurden in den

Reaktionsraum der Warburggefäße einpipettiert. Der Brunnen der Gefäße enthielt einen schmalen Filterpapierstreifen (1 cm x 3 cm) und 0,2 ml KOH (10%ig). Die seitlichen Ansatzbirnen wurden mit jeweils 0,4 ml Nitritlösung ($1,2 \times 10^{-2}$ M) und 0,4 ml Hemmstofflösung (bzw. Lösungsmittel bei den Kontrollgefäßen) beschickt. Danach wurden die Gefäße bei 25° C 20 Minuten im Dunkeln geschüttelt. Während dieser Angleichungszeit erfolgte für die Untersuchung der anaeroben Lichtassimilation die Begasung mit reinstem Stickstoff. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurde aus der einen Ansatzbirne die Hemmstofflösung in den Hauptraum zugekippt. Zu Versuchsbeginn erfolgte die erste Ablesung der Manometer und das Zukippen der Nitritlösung aus der zweiten Ansatzbirne. Während der Versuchszeit von 2 Stunden wurden die Gefäße geschüttelt und mit Starklicht (8000 Lux) von unten beleuchtet. Anschließend wurden die Algensuspensionen mit Hilfe einer gebogenen Pipette möglichst schnell aus den Reaktionsgefäßen entnommen und zweimal scharf abzentrifugiert. In der überstehenden klaren Lösung wurde Nitrit wie folgt bestimmt: 1 ml des klaren Überstands wurde zu 20 ml H₂O pipettiert. Nach dem Vermischen wurden 2 ml dieser Lösung mit 5 ml Ilosvays Reagens versetzt und umgeschüttelt. Die Extinktion des roten Farbstoffes wurde dann wie oben bestimmt und durch Umrechnen die Ausgangskonzentration an Nitrit in der überstehenden Lösung ermittelt.

Zur Bestimmung der NH₃-Konzentration wurden 2,0 ml des klaren Überstands mit 2 Tropfen Nessler's Reagens versetzt und umgeschüttelt. Nach 20 Minuten wurde die Extinktion des gelben Farbstoffes bei 413 nm im Spektralphotometer gegen eine NH₃-freie Blindprobe gemessen. Durch Vergleich mit einer Eichkurve wurde die NH₃-Konzentration ermittelt.

Bei Versuchen mit höheren Konzentrationen an DNP, DSPD oder DCMU erfolgte die Bestimmung der NH₃-Konzentration nach Diffusion in Conway-Gefäßen (abgeändert nach Hewitt u. Nicholas, 1964).

Messung der Dunkelatmung. Der respiratorische O₂-Verbrauch wurde in Warburggefäßen mit Filterstreifen und 10%iger KOH im Zentralbrunnen bei 25° C gemessen. Die Versuchssuspensionen (4 ml) wurden 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit 0,4 ml

Hemmstofflösung sowie 0,4 ml H_2O aus den Ansatzbirnen versetzt. Auch hier betrug die Versuchszeit 2 Stunden.

Herstellung eines zellfreien Extraktes. Gut gewaschene Algen wurden mit Glasperlen (Durchmesser 0,33 mm) vermengt und im Homogenisator (Fa. Bühler, Tübingen, Typ Vi 2) bei $4^{\circ}C$ zerstört. Die größeren Partikel wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren in einer Omikron-Zentrifuge (Fa. Christ, Osterode) bei $10000 \times g$ und $4^{\circ}C$ entfernt. Der Überstand diente zur Bestimmung der Enzym-Aktivitäten (vgl. Morris u. Syrett, 1965).

Bestimmung der Enzym-Aktivität im zellfreien Extrakt. Die Nitritreduktion wurde mit reduziertem Methylviologen als künstlichem Elektronendonator durchgeführt (Joy u. Hageman, 1966). 3,0 ml Testvolumen enthielten neben 0,5 ml Extrakt (in μ Molen): $NaNO_2$ 0,25; Methylviologen 1,0; $Na_2S_2O_4$ 7,5; Phosphatpuffer 0,05 M, pH 7,5. Als Kontrolle diente ein Gefäß, dem kein Extrakt zugegeben wurde.

Der Test wurde in Thunberg-Röhrchen durchgeführt, die eine Zugabe des Dithionits nach dem Evakuieren erlaubten. Nach 30 Minuten bei $25^{\circ}C$ wurden die Röhrchen geöffnet, zur Zerstörung des restlichen Dithionits kräftig geschüttelt und dann die Nitritkonzentration wie angegeben bestimmt.

Messung der anaeroben Dunkelreduktion. Die Messung der unter einer H_2 -Atmosphäre ablaufenden anaeroben Dunkelreduktion von Nitrit wurde in Anlehnung an die anaerobe Lichtassimilation durchgeführt. Die Warburggefäße wurden jedoch mit reinstem H_2 begast und nicht belichtet. Nach einer Dunkeladaptation von 2 Stunden wurde Nitrit aus der Ansatzbirne zugekippt und die H_2 -Aufnahme und der Nitritverbrauch während der folgenden 2 Stunden gemessen. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Hemmstofflösungen den Algensuspensionen zugesetzt. Nitritbestimmung und Bestimmung der NH_3 -Konzentration erfolgten wie bei der Messung der Lichtassimilation.

Bestimmung der DNP-Konzentration. Die DNP-Konzentration wurde nach dem Abzentrifugieren der Algen im klaren Überstand bestimmt. Dazu wurde 1,0 ml des Überstands zu 20 ml H_2O pipettiert und nach dem Umschütteln die Extinktion der Lösung im Spektralphotometer bei 360 nm gegen Wasser gemessen. Aus einer

Eichkurve konnte die Konzentration an DNP entnommen und daraus der Gehalt im Überstand berechnet werden.

Bezugsgrößen. Als gut geeignete Bezugsgröße bei Versuchen mit intakten Zellen erwies sich das Trockengewicht, solange keine nennenswerte Bildung von Sekundärstoffen erfolgte. Als Bezugswert für Versuche im zellfreien Extrakt wurde der Gehalt an löslichen Proteinen gewählt. Deren Bestimmung erfolgte nach Beisenherz et al. (1953).

Die angegebenen Meßwerte sind Mittelwerte aus drei bis vier Versuchsserien mit jeweils zwei bis drei Parallelgefäßen. Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrollen bzw. als Absolutwerte angeführt.

Ergebnisse

I. Assimilation von Nitrit im Dunkeln.

1. Wirkung von DNP.

Die Unterbindung der endergonischen Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat während des exergonischen Elektronentransports im Verlauf der Atmungskette oder der photosynthetischen Primärprozesse eröffnet die Möglichkeit, den ATP-Pool der Zellen niedrig zu halten. ATP-abhängige Stoffwechselprozesse werden deshalb durch eine "Entkopplung" der Phosphorylierungen blockiert.

Als wirksames Phosphorylierungsgift hat sich 2,4-Dinitrophenol (DNP) erwiesen. Seine entkoppelnde Wirkung auf die Atmungskettenphosphorylierung wurde an tierischen (Loomis u. Lipmann, 1948) und pflanzlichen Zellen (Bonner u. Millerd, 1953) aufgezeigt.

Auch die Photophosphorylierungen hemmt DNP deutlich (Neumann u. Jagendorf, 1964), aber weniger stark als die oxydative Phosphorylierung (Simonis u. Urbach, 1960). Nach Arnon et al. (1967) wirkt es in vitro vorzugsweise auf die zyklische Photophosphorylierung. Eine Zusammenstellung der Wirkungen von DNP auf verschiedene endergonische Stoffwechselprozesse geben Kessler (1955) und Kandler (1958).

Abb. 1 zeigt den Einfluß verschiedener DNP-Konzentrationen auf die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit (vgl. Kessler, 1955; Hattori, 1962). DNP hemmt mit zunehmender Konzentration diese Reaktion. Bei einer DNP-Konzentration von 10^{-4} Mol/l und bei einem pH-Wert von 6,5 beträgt die Hemmung 50 %. Das Ausmaß der Blockierung hängt vom pH-Wert ab; bei pH 4,0 hemmen gleiche Konzentrationen an DNP bedeutend stärker als bei pH 6,5 (vgl. Kessler, 1955). Der Grund dafür ist wohl eine bevorzugte Aufnahme der schwachen Säure DNP in undissoziierter Form, die bei pH 4,0 in höherer Konzentration vorliegt als bei pH 6,5 (Stenlid, 1949; Barber u. Koontz, 1963). Auffallend ist die schwache Förderung der Dunkelassimilation bei 10^{-6} M DNP und pH 6,5, die öfters beobachtet werden konnte (vgl. Kessler, 1955).

DNP könnte die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit durch Blockieren der Atmung unterbinden, da zur Nitritreduktion

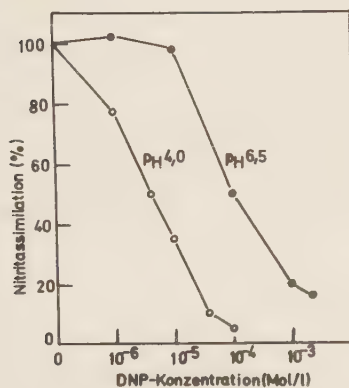


Abb. 1. Hemmung der Nitritassimilation im Dunkeln durch DNP.
Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5
und pH 4,0.

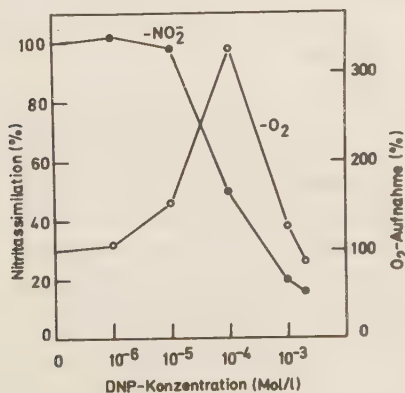


Abb. 2. Wirkung von DNP auf die Assimilation von Nitrit im
Dunkeln und auf die respiratorische O₂-Aufnahme.
Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Elektronendonatoren aus dem Atmungsstoffwechsel benötigt werden (Kessler, 1953). Deshalb war es notwendig, die Wirkung von DNP auf die respiratorische O_2 -Aufnahme zu untersuchen. Diese gibt ein Maß für die bei den Dehydrierungsvorgängen des Atmungsstoffwechsels gebildeten Elektronendonatoren (H-Donatoren) und für die Intensität des Elektronentransports während der Atmungskette (Endoxydation).

Abb. 2 zeigt ein typisches Versuchsergebnis (vgl. Stenlid, 1949; Kessler, 1955; Kandler, 1958). Mit zunehmender DNP-Konzentration nimmt die O_2 -Aufnahme zu, bis sie bei 10^{-4} M DNP ein Maximum erreicht. Die Blockierung der aeroben Dunkelassimilation von Nitrit beträgt unter diesen Bedingungen 50 %. Höhere DNP-Konzentrationen verringern die respiratorische O_2 -Aufnahme wieder. 2×10^{-3} M DNP blockiert die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit fast vollständig, während die Atmung nur geringfügig gehemmt ist. Die Hemmung der Nitritassimilation hat ihren Grund also nicht im Fehlen von Elektronendonatoren, die durch den Atmungsstoffwechsel in ausreichenden Konzentrationen bereitgestellt werden. Es ist daher mit Kessler (1955) anzunehmen, daß DNP auf Grund seines Entkopplungseffektes den ATP-Pool der Zellen niedrig hält und somit die Dunkelassimilation von Nitrit blockiert.

2. Reduktion von DNP durch intakte Zellen im Dunkeln.

Del Campo et al. (1966) sowie Ahmad u. Morris (1967) erklären jedoch die Hemmbarkeit der Dunkelassimilation durch die Annahme, daß die Nitrogruppen des DNP anstelle von Nitrit reduziert und dadurch dem Nitrit Elektronendonatoren entzogen würden. Demnach müßte DNP im Dunkeln von den Algen reduziert werden. Tab. 1 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Während die Nitritkonzentration um mehr als 60 % (bzw. 40 % bei Zusatz von DNP) abnimmt, wird kein DNP von den Algen reduziert. DNP hemmt also die Dunkelassimilation nicht dadurch, daß es anstelle von Nitrit reduziert wird.

3. Ausscheidung von Nitrit in nitrathaltigem Medium bei DNP-Zusatz.

Das stärkste Argument zugunsten der Annahme, die Assimilation von Nitrit sei ATP-abhängig, ist folgender Befund: Intakte Zellen von *Ankistrodesmus* assimilieren im Dunkeln Nitrat ohne nennenswerte Nitritausscheidung. Nach DNP-Zusatz wird jedoch

Tab. 1.

Reduktion von Nitrit und DNP im Dunkeln.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Zeit (Std.)	Nitrit-Konzentration ($\times 10^{-5}$ Mol/l)		DNP-Konzentration ($\times 10^{-5}$ Mol/l)	
	- DNP	+ DNP	-Nitrit	+ Nitrit
0	9,6	9,6	5,7	5,7
2	3,5	5,4	5,7	5,7

Tab. 2.

Wirkung von DNP auf die Ausscheidung von Nitrit im Nitrat-Medium.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Nitrat: $1,7 \times 10^{-2}$ Mol/l.

DNP-Konzentration (Mol/l)	0	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	2×10^{-3}
Nitritausscheidung ($\times 10^{-5}$ Mol/l/mg/2 Std.)	0,7	0,7	0,9	11,3	11,3	10,9

Tab. 3.

Aerobe und anaerobe Reduktion von Nitrit im Dunkeln.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Nitrit: 10^{-3} Mol/l.

	Nitritaufnahme ($\times 10^{-5}$ Mol/l/mg/2 Std.)	NH ₃ -Ausscheidung ($\times 10^{-5}$ Mol/l/mg/2 Std.)
Luft	12,0	1,1
N ₂	5,7	4,0

reichlich Nitrit ausgeschieden (Tab. 2). Die Dunkelreduktion von Nitrat zu Nitrit ist demnach durch DNP weniger stark blockiert als die Weiterreduktion und Assimilation des Zwischenprodukts Nitrit, so daß es zur Ausscheidung desselben ins Außenmedium kommt (Kessler, 1955). Ahmad u. Morris (1967) zeigten zwar, daß auch die Aufnahme von Nitrat (bei geringer Nitratkonzentration) durch DNP gehemmt wird, sie bestätigen aber auch den eben erwähnten Befund der Nitritausscheidung bei Anwendung hoher Nitratkonzentrationen.

4. Wirkung von Anaerobiose und Glucose.

Sollte die Hypothese von Kessler gültig sein, dann müßte ein durch Anaerobiose verminderter ATP-Pool ebenfalls Auswirkungen auf die Dunkelassimilation von Nitrit zeigen. Tab. 3 erläutert diesen Einfluß. Anaerobiose hemmt die Dunkelassimilation zu etwa 50 % (Kessler, 1953). Erhöht man umgekehrt die Atmung durch Zusatz von Glucose, so nimmt auch die Dunkelassimilation von Nitrit zu (Tab. 4). Bemerkenswert ist, daß unter Anaerobiose der als Nitrit aufgenommene Stickstoff in reduzierter Form als NH_3 fast vollständig ausgeschieden wird, während eine NH_3 -Ausscheidung unter Aerobiose kaum auftritt (Tab. 3). Dieses Ergebnis zeigt deutlich die Abhängigkeit der aeroben Dunkelreduktion und vor allem der Dunkelassimilation des Nitrits von einer ATP-Anlieferung aus der oxydativen Phosphorylierung.

5. Wirkung von Arsenat.

Eine weitere Möglichkeit, die von der Atmung abhängige (und auch die photosynthetische) Bildung von ATP zu unterbinden, ist die Hemmung der Phosphorylierungen durch Arsenat. Dabei wird - analog der endergonischen Synthese von ATP aus ADP und Phosphat - der Arsensäureester des ADP gebildet. Dieser ist aber instabil und zerfällt hydrolytisch sofort nach seiner Bildung, weshalb er als Energieüberträger ungeeignet ist (Braunstein, 1931; Crane u. Lipmann, 1953; Krogmann et al., 1959). ATP-abhängige Stoffwechselprozesse können daher durch Arsenat gehemmt werden (vgl. Kessler u. Bucker, 1960).

Den Einfluß von Arsenat auf die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit zeigt Abb. 3. Arsenat hemmt mit zunehmender Kon-

Tab. 4.

Erhöhung der Assimilation von Nitrit im Dunkeln durch Glucose.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Glucose ($\times 10^{-2}$ Mol/l)	Nitritaufnahme ($\times 10^{-5}$ Mol/l/mg/2 Std.)
0	5,8
2,5	7,1

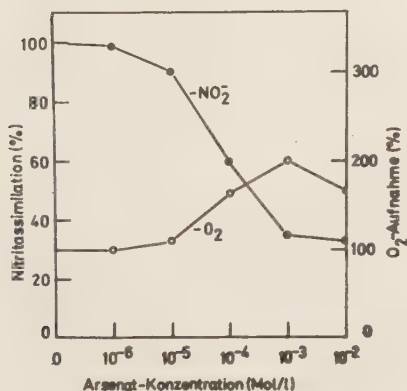


Abb. 3. Wirkung von Arsenat auf die Assimilation von Nitrit im Dunkeln und auf die respiratorische O₂-Aufnahme.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

zentration diese Reaktion und fördert die respiratorische O_2 -Aufnahme (vgl. Kessler u. Bucker, 1960). Allerdings wirken erst höhere Arsenatkonzentrationen (10^{-3} bis 10^{-2} Mol/l). Arsenat verursacht ebenso wie DNP eine Nitritausscheidung in nitrathaltigem Medium (Tab. 5). Die Assimilation des Zwischenproduktes Nitrit wird also auch durch Arsenat stärker gehemmt als die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Erwähnt sei, daß die Hemmwirkung von Arsenat auf die Dunkelassimilation von Nitrit von der Phosphatkonzentration im Suspensionsmedium abhängt. In phosphathaltigem Medium ist die Hemmung durch Arsenat geringer als in phosphatfreiem (vgl. Kessler u. Bucker, 1960). Denn in letzterem verläuft die Konkurrenz zwischen Arsenat und Phosphat um das ADP zugunsten des Arsenats.

Die Hemmbarkeit der Dunkelassimilation von Nitrit durch Arsenat weist ebenfalls auf eine ATP-Abhängigkeit dieses Stoffwechselprozesses hin. Denn Arsenat kann nicht mit Nitrit um die Elektronendonatoren der Zelle konkurrieren.

6. Wirkung von CCCP und PCP.

Ebenso wie Arsenat sind andere Phosphorylierungsgifte, die keine reduzierbaren Nitrogruppen enthalten, zur Untersuchung der ATP-Abhängigkeit der Nitritassimilation geeignet.

In letzter Zeit haben sich zwei Verbindungen als sehr wirksame Entkoppler herausgestellt, nämlich Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) und Pentachlorphenol (PCP). Heytler und Prichard (1962) fanden, daß CCCP ein in geringer Konzentration wirksames Gift darstellt, das sowohl die oxydative wie die photosynthetischen Phosphorylierungen sehr stark entkoppelt.

In Abb. 4 ist die Wirkung verschiedener CCCP-Konzentrationen auf die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit und auf die respiratorische O_2 -Aufnahme dargestellt. Steigende CCCP-Konzentrationen hemmen die Dunkelassimilation zunehmend. Bei einer Konzentration von 10^{-5} Mol CCCP pro Liter beträgt sie 50 %. Die respiratorische O_2 -Aufnahme erreicht bei dieser Konzentration ihr Maximum; mit weiter zunehmender CCCP-Konzentration geht die respiratorische O_2 -Aufnahme zurück. Erwähnenswert ist eine leichte Erhöhung der aeroben Dunkelassimilation von Nitrit bei einer CCCP-Konzentration von 10^{-8} Mol/l, wie sie auch bei einer DNP-Konzentration von 10^{-6} Mol/l beobachtet wurde.

Tab. 5.

Wirkung verschiedener Phosphorylierungsgifte auf die Nitritausscheidung im Nitrat-Medium.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Nitrat: $1,7 \times 10^{-2}$ Mol/l.

Hemmstoff		Nitritausscheidung ($\times 10^{-5}$ Mol/l/mg/2 Std.)
DNP	(10^{-4} Mol/l)	11,3
Arsenat	(10^{-3} Mol/l)	2,5
CCCP	(10^{-5} Mol/l)	10,9
PCP	(10^{-5} Mol/l)	3,4

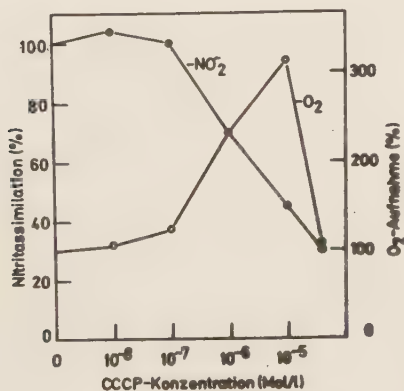


Abb. 4. Wirkung von CCCP auf die Assimilation von Nitrit im Dunkeln und auf die respiratorische O₂-Aufnahme.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Ähnliche Wirkungen auf die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit und die respiratorische O_2 -Aufnahme zeigt das Pentachlorphenol (PCP). Diese Substanz wurde von Weinbach (1954) als entkoppelndes Agens der oxydativen und der photosynthetischen Phosphorylierungen beschrieben. Aus Abb. 5 geht hervor, daß PCP bei einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l ein Maximum der respiratorischen O_2 -Aufnahme hervorruft. Die mit steigender PCP-Konzentration zunehmende Hemmung der aeroben Dunkelassimilation von Nitrit beträgt bei der angegebenen Konzentration 50 %.

Die Hemmbarkeit der Dunkelassimilation von Nitrit durch CCCP und PCP sollte sich in einer weiteren Erscheinung zeigen: in nitrathaltigem Medium müßten CCCP und PCP die Ausscheidung von Nitrit fördern. Tatsächlich ist das auch der Fall, wie aus Tab. 5 hervorgeht.

7. Wirkung der Phosphorylierungsgifte auf die Reduktion von Nitrit in vitro.

Hattori u. Myers (1966) beschrieben für *Anabaena cylindrica* einen hemmenden Einfluß von DNP und Arsenat auf die Reduktion von Nitrit in vitro. Losada et al. (1963) und Paneque et al. (1964) konnten jedoch keinen Einfluß dieser Phosphorylierungsgifte auf die Nitritreduktase in vitro feststellen. Deshalb schlossen sie auf eine Unabhängigkeit der Nitritreduktion von energiereichem Phosphat (ATP). Es war daher zu klären, ob die angewendeten Phosphorylierungsgifte das Enzym Nitritreduktase blockieren. Tab. 6 gibt die Wirkung der eingesetzten Inhibitoren auf die Reduktion von Nitrit in vitro bei *Ankistrodesmus braunii* wieder. PCP, CCCP und Arsenat beeinflussen diese Reaktion nicht. Also muß die Hemmstelle an einem anderen Ort des Gesamtvorgangs der Dunkelassimilation zu suchen sein. Ein entsprechender Versuch mit DNP war nicht möglich, weil unter den angewendeten Versuchsbedingungen DNP mit Dithionit reagiert, was eine genaue Messung verhindert.

8. Einfluß von Phosphat und Chlorid.

Da ATP in der intakten Zelle für eine Reihe Energieverbrauchender Stoffwechselvorgänge notwendig ist (Kessler, 1955; Kandler, 1958), war zu erwarten, daß Untersuchungen über Konkurrenzreaktionen um das in den Zellen vorhandene ATP wei-

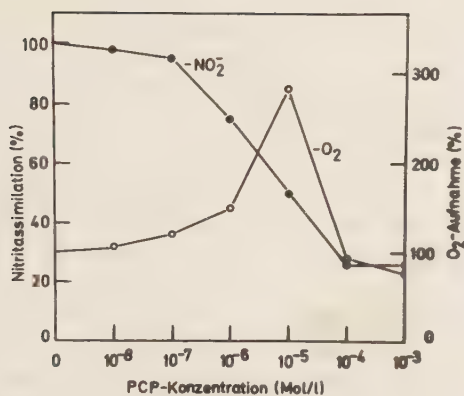


Abb. 5. Wirkung von PCP auf die Assimilation von Nitrit im Dunkeln und auf die respiratorische O₂-Aufnahme.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Tab. 6.

Wirkung verschiedener Phosphorylierungsgifte auf die Nitritreduktion in vitro.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5.

Versuchsdauer 30 Minuten.

Hemmstoff	Nitritreduktion	
	(x 10 ⁻⁵ Mol/l/0,5 ml Extrakt)	
ohne	3,4	
PCP (10 ⁻⁵ Mol/l)	3,3	
CCCP (10 ⁻⁵ Mol/l)	3,2	
Arsenat (10 ⁻² Mol/l)	3,3	

tere Aufschlüsse bringen würden.

Eine Reaktion, die unter ATP-Verbrauch abläuft, ist die Aufnahme und anschließende Assimilation von Phosphat durch intakte Zellen (Kylin, 1967). Eine Wirkung von Orthophosphat auf die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit ist aber bei normal angezogenem *Ankistrodesmus braunii* nicht deutlich feststellbar. So bewirken Phosphatkonzentrationen von 10^{-2} Mol/l nur eine geringe Stimulation der Dunkelassimilation. Untersucht man dagegen den Einfluß von Phosphat auf P-Mangelalgen, so wird mit steigender Außenkonzentration an Phosphat die Dunkelassimilation von Nitrit zunehmend geringer (Abb. 6). Sie erreicht bei 10^{-3} M Phosphat ein Minimum; die Hemmung beträgt 35 %. Höhere Konzentrationen an Phosphat fördern die Dunkelassimilation wieder, und bei 10^{-2} M Phosphat und mehr gleicht die Dunkelassimilation bei den P-Mangelalgen der entsprechenden Reaktion bei Normalalgen.

Ähnliche Wirkungen von Phosphat auf die ATP-abhängige Aufnahme von Chlorid und Sulfat beschreibt Kylin (1967) für *Scenedesmus*. Demnach müßte ein Zusatz von Chlorid zum Versuchsmedium ebenfalls eine verringerte Nitritassimilation zur Folge haben. Abb. 7 bestätigt diese Erwartung. Bei *Ankistrodesmus braunii* hemmt Chlorid mit zunehmender Konzentration die Dunkelassimilation von Nitrit. Die Hemmung bei 10^{-2} M Chlorid beträgt 25 %.

9. Wirkung von K-Mangel.

Pirson et al. (1952) beobachteten bei *Chlorella* eine Hemmung der Photosynthese und eine Erhöhung der Atmung durch K-Mangel. Ein Zusatz von KCl normalisierte die Stoffwechselverhältnisse innerhalb kurzer Zeit. Pirson (1955) nahm an, daß durch den Mangel an K^+ die Phosphorylierungsvorgänge unterbunden würden (vgl. auch Blond u. Whittam, 1964). Latzko u. Claus (1958) geben eine Steigerung der respiratorischen Phosphorylierung durch K^+ bei *Saccharomyces cerevisiae* an. Daher war es naheliegend, den Einfluß von K-Mangel auf die Dunkelassimilation von Nitrit bei *Ankistrodesmus* zu untersuchen.

Aus Tab. 7 können die Ergebnisse entnommen werden. Ein Zusatz von 10^{-3} Mol K^+ pro Liter zu den Mangelkulturen steigert im Laufe einiger Stunden die Dunkelassimilation von Nitrit.

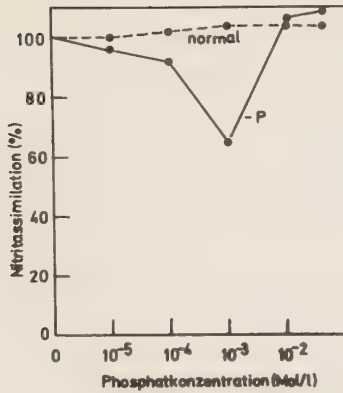


Abb. 6. Wirkung von Orthophosphat auf die Assimilation von Nitrit im Dunkeln bei P-Mangelalgen und bei Normalalgen.

Ankistrodesmus braunii, 6 Tage alte Kulturen.
0,05 M Citratpuffer, pH 6,5.

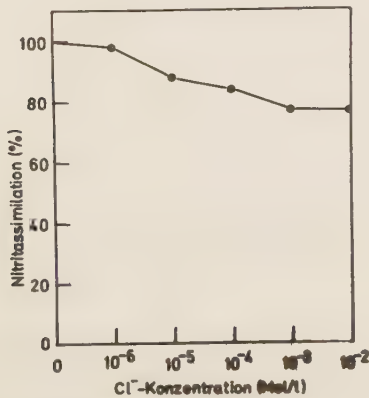


Abb. 7. Wirkung von Chlorid auf die Assimilation von Nitrit im Dunkeln.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Citratpuffer, pH 6,5.

Tab. 7.

Wirkung von K^+ auf die Assimilation von Nitrit durch K-Mangelalgen im Dunkeln.

Ankistrodesmus braunii, 7 Tage K-Mangel.

0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5

	Assimiliertes Nitrit ($\times 10^{-5}$ Mol/l) nach			
	1	3 1/2	5 1/2	7 1/2 Std.
Kontrolle	1,4	6,0	10,2	14,0
NaH_2PO_4 (10^{-3} Mol/l)	1,5	6,2	10,0	13,8
KH_2PO_4 (10^{-3} Mol/l)	1,8	7,0	12,0	17,1

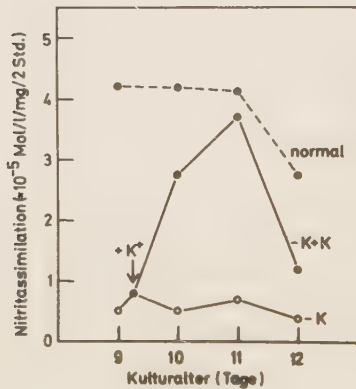


Abb. 8. Wirkung von K^+ (10^{-3} Mol/l) auf die Assimilation von Nitrit im Dunkeln bei K-Mangelalgen.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Wird K^+ durch Na^+ ersetzt, tritt keine Erhöhung der Assimilationsrate ein. Setzt man K^+ (10^{-3} Mol/l) den K-Mangelkulturen zu und kultiviert weiter, dann beobachtet man ebenfalls eine langsame Erhöhung der Dunkelassimilation, aber erst nach einigen Tagen gleicht sich dieser Stoffwechselprozeß den entsprechenden Werten gleichaltriger Normalkulturen an (Abb. 8).

Die bei K-Mangel erhöhte respiratorische O_2 -Aufnahme nimmt dagegen nach Zufuhr von 10^{-3} Mol K^+ pro Liter innerhalb von 3 - 4 Stunden deutlich ab und nähert sich dem Wert von Normalkulturen (Abb. 9; vgl. Pirson et al., 1952). Der Einfluß von K-Mangel auf die Dunkelassimilation von Nitrit ähnelt also den Wirkungen der schon erwähnten Phosphorylierungsgifte. Man könnte darin einen weiteren Beleg für die Annahme sehen, daß zur Assimilation von Nitrit energiereiches Phosphat benötigt wird. Daß dieser Befund aber nicht unbedingt in diesem Sinne gedeutet werden kann, zeigt die für eine Erhöhung der Nitritassimilation benötigte lange Erholungszeit von einigen Stunden bis Tagen. Während dieses Zeitraumes können im Enzymapparat der Nitritassimilation durch Neusynthesen Veränderungen vorstatten gehen, die eine Aussage über die Wirkung des K-Mangels im Sinne einer Phosphorylierungshemmung und damit einer Blockierung der Dunkelassimilation unzulässig machen. Interessant ist in diesem Zusammenhang ein Befund von Nitsos u. Evans (1966), die für *Neurospora crassa* die Förderung der Synthese der Nitratreduktase durch Zufuhr von K^+ zu einer K-Mangelkultur beschreiben. Aus diesen Gründen läßt also die geringe Förderung der Nitritassimilation im Dunkeln bei Zufuhr von K^+ zu K-Mangelalgen keine eindeutige Aussage zu.

II. Photosynthetische Nitritassimilation.

Schon frühzeitig wurde erkannt, daß Licht die Assimilation von Nitrit bei *Ankistrodesmus braunii* sehr stark fördert (Kessler, 1953, 1957 a). Auch bei anderen photosynthetisch aktiven Organismen konnte dieser Befund bestätigt werden. Hattori (1962) gab an, daß bei der lichtabhängigen Reduktion von Nitrit durch *Anabaena cylindrica* Ammoniak als Reduktionsprodukt ausgeschieden wird. Es liegt also in diesem Falle keine Nitritassimilation im eigentlichen Sinne vor. Die Elektronen-

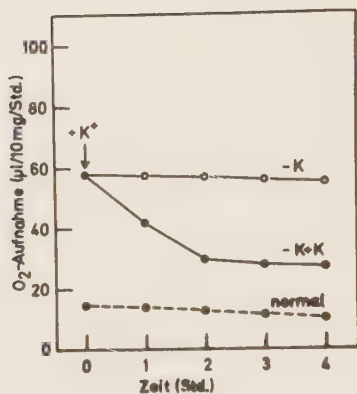


Abb. 9. Wirkung von K^+ (10^{-3} Mol/l) auf die respiratorische O_2 -Aufnahme bei K-Mangelalgen.

Ankistrodesmus braunii, 8 Tage alte Kulturen.

0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

Tab. 8.

Anaerobe photosynthetische Reduktion von Nitrit und DNP.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

N_2 ; 8000 Lux.

Zeit (Std.)	Nitrit-Konzentration ($\times 10^{-5}$ Mol/l)		DNP-Konzentration ($\times 10^{-5}$ Mol/l)
	- DNP	+DNP	
0	100,0	100,0	10,0
2	34,3	54,5	9,7

donatoren für die lichtabhängige Reduktion des Nitrits werden durch photosynthetische Primärprozesse bereitgestellt, denn bei dieser Reaktion wird O_2 in stöchiometrischem Verhältnis produziert (Kessler, 1957 a). Man kann also hier von einer photosynthetischen Reduktion des Nitrits sprechen.

Strotmann (1967 b) konnte jedoch bei *Chlorella fusca* keine Ausscheidung von Ammoniak finden. Das Nitrit wird in diesem Falle vollständig assimiliert, worauf auch die von diesem Autor festgestellte direkte Beziehung zwischen CO_2 -Angebot und Nitritassimilation im Starklicht hinweist (vgl. auch Hattori, 1962). Bei Belichtung läuft aber nicht nur diese photosynthetische Nitritassimilation ab, sondern auch die von der Atmung abhängige Assimilation (Strotmann, 1967 a). Kessler (1957 a) unterbindet daher den zuletzt genannten Vorgang durch Anaerobiose.

Für die photosynthetische Nitritassimilation sind nach Kessler (1957 a) Elektronendonatoren, Kohlenhydrate und ATP nötig. Das ATP wird offenbar im Verlauf der photosynthetischen Primärprozesse bereitgestellt. Paneque et al. (1964) fanden dagegen, daß auch bei der Reduktion von Nitrit in vitro durch belichtete Chloroplastensysteme ATP synthetisiert wird. Einen Verbrauch von ATP während der lichtabhängigen Nitritreduktion in vitro stellten sie nicht fest. Die photosynthetische Nitritassimilation in vivo kann aber durch DNP gehemmt werden (Kessler, 1957 a; Hattori, 1962). Kessler schließt aus dieser Tatsache auf eine Abhängigkeit der photosynthetischen Nitritassimilation intakter Zellen von energiereichem Phosphat (ATP). Nach Arnon et al. (1967) greift DNP hemmend in die Photophosphorylierungsvorgänge ein, indem es vor allem die zyklische Photophosphorylierung vermindert.

Eine andere Erklärung für die hemmende Wirkung des DNP auf die photosynthetische Nitritassimilation ist nach Wessels (1959, 1965) darin zu finden, daß DNP von belichteten Chloroplasten reduziert wird. Demnach wäre eine Konkurrenz zwischen DNP und Nitrit um die photosynthetischen Elektronendonatoren nicht auszuschließen (Del Campo et al., 1966).

1. Lichtabhängige Reduktion von DNP.

Intakte Zellen von *Ankistrodesmus braunii* reduzieren unter N_2 DNP nur in Spuren (Tab. 8). Eine Konkurrenz zwischen DNP

und Nitrit um die photosynthetischen Elektronendonatoren ist daher auszuschließen.

2. Wirkung von Anaerobiose und Phosphorylierungsgiften.

Kessler (1957 a) führte die photosynthetische Nitritassimilation unter Anaerobiose durch, während Strotmann (1966, 1967 a,b) aerob arbeitete. Für *Ankistrodesmus* lagen noch keine vergleichenden Untersuchungen vor.

In Abb. 10 ist die photosynthetische Nitritassimilation für diesen Organismus unter beiden Versuchsbedingungen angegeben. *Ankistrodesmus braunii* nimmt sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen Nitrit auf und reduziert es zu NH_3 . Dieses wird zum Teil ausgeschieden. Daher ist die photosynthetische Nitritreduktion zu unterscheiden von der nachfolgenden lichtabhängigen Assimilation von NH_3 . Beide Stoffwechselprozesse werden durch Anaerobiose gehemmt. Diese Verminderung der NH_3 -Assimilation beschrieb Hattori (1962) auch für *Anabaena cylindrica*. Anscheinend wird für die lichtabhängige Assimilation von NH_3 sowie für die photosynthetische Nitritreduktion ATP benötigt. Demnach müßte die Hemmung der Photophosphorylierungen eine Verringerung beider Prozesse zur Folge haben. CCCP hemmt die Photophosphorylierungen, beeinträchtigt den photosynthetischen Elektronentransport aber nicht (Bishop u. Gaffron, 1963). Abb. 11 zeigt die Wirkung dieses Phosphorylierungsgiftes auf die aerobe und anaerobe Lichtassimilation von Nitrit.

PCP wirkt in gleichem Sinne. Es blockiert wie CCCP die photosynthetische Nitritreduktion und unter aeroben Bedingungen die Assimilation des Ammoniaks. Die unter Anaerobiose schon beträchtlich verminderte NH_3 -Assimilation wird dagegen durch beide Substanzen nicht beeinflusst.

Auch die Phosphorylierungsgifte Arsenat und DNP wirken in gleicher Richtung, wie Abb. 12 zeigt. Die Verminderung der photosynthetischen Nitritassimilation ist aber bei gleichen DNP-Konzentrationen geringer als die Hemmung der Dunkelassimilation von Nitrit und hängt außerdem vom pH-Wert ab (Abb. 13). Bei pH 4,0 ist die photosynthetische Nitritassimilation durch gleiche DNP-Konzentrationen stärker beeinträchtigt als bei pH 6,5.

Strotmann (1967 b) hatte für *Chlorella fusca* unter aeroben

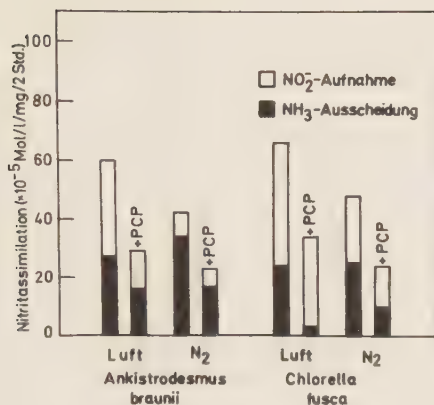


Abb. 10. Aerobe und anaerobe photosynthetische Nitritassimilation bei *Ankistrodesmus braunii* und *Chlorella fusca*. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5. PCP: 10^{-5} Mol/l.

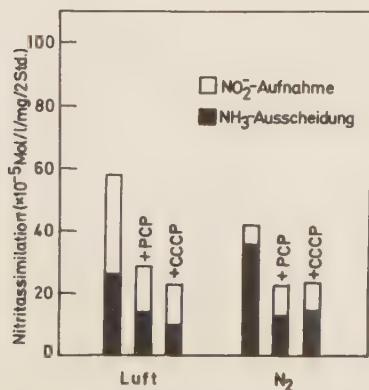


Abb. 11. Hemmung der aeroben und anaeroben photosynthetischen Nitritassimilation durch PCP und CCCP.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5. PCP: 10^{-5} Mol/l; CCCP: 10^{-5} Mol/l.

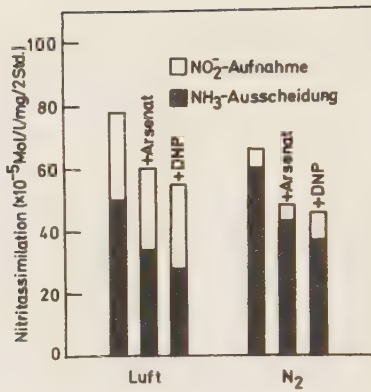


Abb. 12. Hemmung der aeroben und anaeroben photosynthetischen Nitritassimilation durch Arsenat und DNP.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Citratpuffer, pH 6,5.
Arsenat: 10⁻² Mol/l; DNP: 10⁻⁴ Mol/l.

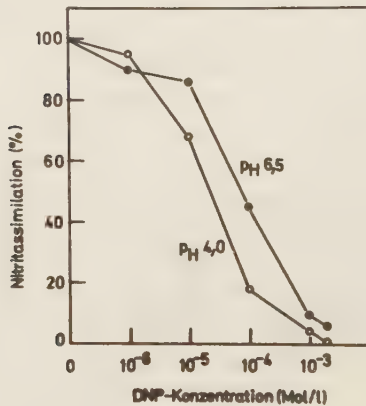


Abb. 13 Hemmung der anaeroben photosynthetischen Nitritassimilation durch DNP.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5 und pH 4,0.

Bedingungen keine Ausscheidung von NH_3 bei Belichtung festgestellt. Es war daher interessant, dieses Objekt unter den angewandten Versuchsbedingungen zu prüfen. Aus Abb. 10 ist zu ersehen, daß auch *Chlorella fusca* sowohl unter Aerobiose als auch unter Anaerobiose NH_3 ausscheidet, also keine vollständige Assimilation des Nitrits stattfindet. Nitritreduktion sowie NH_3 -Assimilation lassen sich aber auch bei diesem Organismus durch PCP hemmen.

3. Wirkung von Chlorid und Phosphat.

Aus den Untersuchungen zur Atmungs-abhängigen Nitritassimilation ergab sich, daß ATP verbrauchende Stoffwechselprozesse die Dunkelassimilation herabsetzen. Da auch für die photosynthetische Nitritreduktion und die anschließende lichtabhängige NH_3 -Assimilation die ATP-Abhängigkeit gilt, sollten ATP verbrauchende Reaktionen diese beiden Stoffwechselvorgänge beeinflussen.

Jeschke (1967) beschreibt für *Elodea* die lichtabhängige Aufnahme von Chlorid, für die ATP aus Photophosphorylierungen notwendig ist. Gleiche Ergebnisse geben Kylin (1967) für *Scenedesmus* und Barber (1968 a) für *Chlorella* an.

In Abb. 14 ist dargestellt, daß Chlorid die photosynthetische Nitritreduktion herabsetzt. Die Hemmung nimmt mit steigenden Chloridkonzentrationen zu. Auch die lichtabhängige NH_3 -Assimilation wird durch Chlorid verringert.

Nach Kylin u. Tillberg (1967) wird Phosphat bei Belichtung durch einen ATP verbrauchenden Assimilationsprozeß aufgenommen. Ein Zusatz von Phosphat hemmt daher die photosynthetische Nitritassimilation bei P-Mangelalgen (Ab. 15). Diese Hemmung nimmt mit steigender Phosphatkonzentration zu, bis bei 10^{-3} M Phosphat ein Minimum der Nitritassimilation erreicht ist. Höhere Phosphatkonzentrationen steigern die lichtabhängige Assimilation von Nitrit wieder.

4. Einfluß von K-Mangel.

Pirson (1955) beschrieb die Hemmwirkung des K-Mangels auf die Photosynthese und vermutete eine Beeinträchtigung der Photophosphorylierung als Ursache. Nach Mechner (1959) fördert K^+ in Konzentrationen zwischen 10^{-5} und 10^{-2} Mol/l die Lichtphosphorylierung. Die Aufnahme von K^+ durch belichtete

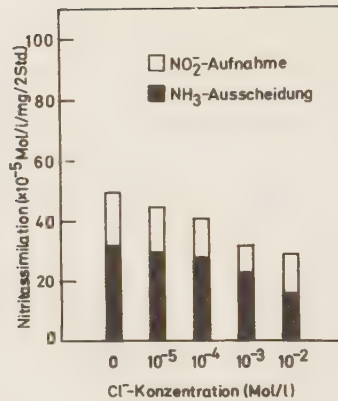


Abb. 14. Wirkung von Chlorid auf die anaerobe photosynthetische Nitritassimilation.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Citratpuffer, pH 6,5.

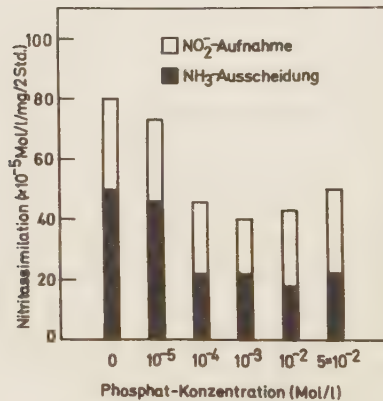


Abb. 15. Wirkung von Orthophosphat auf die anaerobe photosynthetische Nitritassimilation bei P-Mangelalgen.

Ankistrodesmus braunii, 6 Tage alte Kulturen.
0,05 M Citratpuffer, pH 6,5.

Algen beschreibt Barber (1968 b). Dieser Prozeß verläuft unter ATP-Verbrauch (Mac Robbie, 1965). Zufuhr von K^+ zu K-Mangelalgen sollte daher einerseits eine Hemmung der photosynthetischen Nitritassimilation hervorrufen, andererseits aber durch Erhöhung der Photophosphorylierungen den ATP-Pool der Zellen vergrößern. In Abb. 16 ist dargestellt, wie K^+ die photosynthetische Nitritassimilation von K-Mangelalgen beeinflusst. Zu Versuchsbeginn zugesetztes K^+ hemmt die lichtabhängige Nitritassimilation infolge der ATP verbrauchenden K^+ -Aufnahme deutlich. Belichtet man aber die K-Mangelalgen unter Zusatz von K^+ vor Versuchsbeginn, dann macht sich die Förderung der Photophosphorylierungen als Steigerung der photosynthetischen Nitritassimilation bemerkbar.

Hier sei aber nochmals auf eine Interpretationsschwierigkeit hingewiesen: K^+ fördert nicht nur die Photophosphorylierungen, es erhöht auch die Synthese der Nitratreduktase (Nitsos u. Evans, 1966). Eine durch K^+ geförderte Synthese der Nitritreduktase und damit eine Stimulierung der photosynthetischen Nitritassimilation ist also nicht auszuschließen.

5. Einfluß von CO_2 und Glucose.

Strotmann (1966) beschrieb für *Chlorella fusca* die Hemmung der photosynthetischen Nitritassimilation durch CO_2 -Entzug im Starklicht. Zufuhr von CO_2 müßte also diese Reaktion steigern. Diesen Effekt beschreibt Hattori (1962) bei *Anabaena*, Strotmann (1967 b) bei *Chlorella*. Auch für *Ankistrodesmus* wurde gezeigt, daß CO_2 bei 8000 Lux die photosynthetische Nitritreduktion und vor allem die lichtabhängige NH_3 -Assimilation deutlich steigert (Abb. 17). Beide Stoffwechselvorgänge werden durch DNP geringfügig gehemmt.

Da nach Strotmann (1967 b) die Steigerung der lichtabhängigen Nitritreduktion und NH_3 -Assimilation durch CO_2 in der Bereitstellung photosynthetisch produzierter Akzeptoren für das NH_3 besteht, war zu prüfen, ob nicht auch ein Zusatz von Glucose die photosynthetische Nitritassimilation fördern könne. In Abb. 17 ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt. Glucose erhöht erst nach ausreichender Vorbelichtung die lichtabhängige Assimilation von NH_3 , da die Auf-

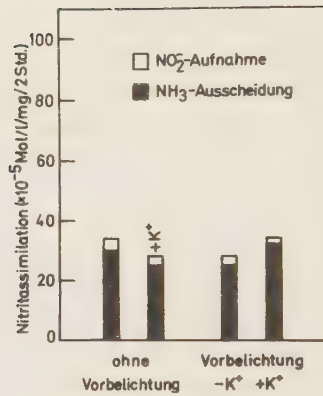


Abb. 16. Wirkung von K^+ (10^{-3} Mol/l) auf die anaerobe photosynthetische Nitritassimilation bei K-Mangelalgen.

Ankistrodesmus braunii, 7 Tage alte Kulturen.

0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

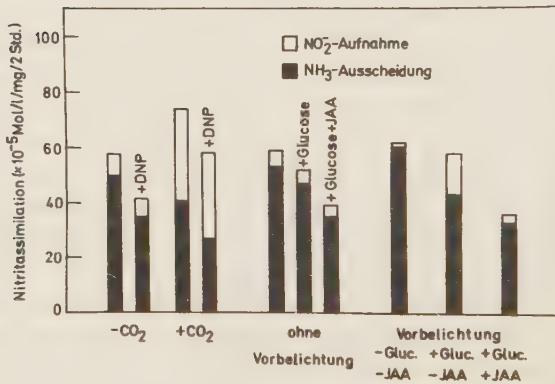


Abb. 17. Förderung der anaeroben photosynthetischen Nitritassimilation durch CO_2 (10^{-3} Mol/l) und Glucose (10^{-2} Mol/l).

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5.

JAA: 5×10^{-5} Mol/l. DNP: 10^{-4} Mol/l.

nahme von Glucose erst nach etwa einer Stunde einsetzt (Tanner u. Kandler, 1967). Glucose kann aber nicht direkt als NH_3 -Akzeptor fungieren, sondern erst nach Umwandlung in andere C-Gerüste. Dieser Vorgang wird durch Jodacetamid (JAA) unterbunden, wodurch die NH_3 -Assimilation ebenfalls blockiert wird. JAA hemmt aber auch die photosynthetische Nitritreduktion selbst (vgl. Strotmann, 1967 b). Die Assimilation der Glucose zu höhermolekularen Kohlenhydraten ist ein unter ATP-Verbrauch ablaufender Stoffwechselprozeß. Die daher erwartete Hemmung der photosynthetischen Nitritassimilation ist aber gering, weil die Glucoseassimilation nur bei ausgehungerten Algen in größerem Umfang auftritt (Tanner u. Kandler, 1967).

6. Wirkung von N-Mangel.

Im Verlauf unserer Untersuchungen wurde festgestellt, daß nur bei jungen, d. h. noch ausreichend ernährten Kulturen die NH_3 -Ausscheidung unter anaeroben Bedingungen fast vollständig ist. Ältere Algen assimilieren mehr NH_3 . Als Grund für diese Erscheinung wurde N-Mangel in älteren Kulturen vermutet. Abb. 18 zeigt den Einfluß von zunehmendem N-Mangel auf die aerobe und anaerobe Lichtassimilation von Nitrit. Vor allem unter Aerobiose nimmt die NH_3 -Assimilation rasch zu. Anaerobiose (und damit Verringerung des ATP-Pools der Zellen durch Unterbindung der auch bei Belichtung ablaufenden Atmung) hemmt ebenso wie PCP die Assimilation des durch Reduktion von Nitrit gebildeten NH_3 . Auf die Höhe der photosynthetischen Nitritreduktion hat zunehmender N-Mangel dagegen keinen Einfluß, solange nicht das Photosynthesesystem selbst gestört wird.

7. Wirkung von DCMU und DSPD.

Wessels (1956) beschrieb die außerordentlich starke Hemmung der Photosynthese durch substituierte Phenylurethane. 2×10^{-7} M Dichlorphenyl-dimethyl-harnstoff (DCMU) hemmt die Hill-Reaktion isolierter Chloroplasten zu 50 %. 3×10^{-6} M DCMU verhindert die O_2 -Produktion intakter Zellen von *Ankistrodesmus* völlig (Bishop, 1958). Das DCMU verhindert lichtabhängige Reduktionsprozesse, weil es die Bereitstellung der Elektronendonatoren durch eine Hemmung im Bereich des Photosystems II blockiert. Auch die photosynthetische Nitritassimilation wird durch DCMU gehemmt (Abb. 19). Die Hemmung ist aber nicht voll-

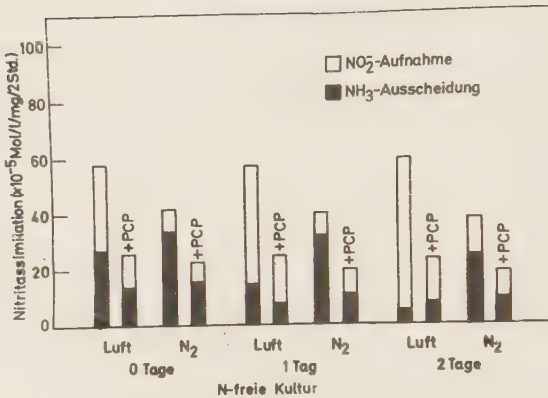


Abb. 18. Aerobe und anaerobe photosynthetische Nitritassimilation bei zunehmendem N-Mangel.

Ankistrodesmus braunii; 8 Tage Normalkultur, danach Kultur in N-freier Nährlösung.

0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5. PCP: 10^{-5} Mol/l.

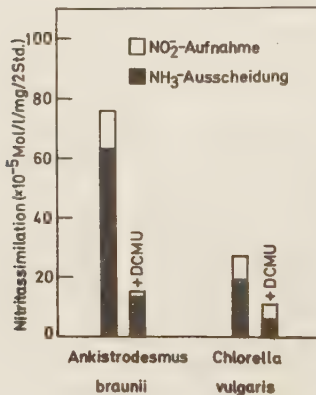


Abb. 19. Hemmung der anaeroben photosynthetischen Nitritassimilation durch DCMU bei Ankistrodesmus braunii und Chlorella vulgaris.

0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5. DCMU: 10^{-5} Mol/l.

ständig, obwohl die O_2 -Produktion völlig unterbunden ist (vgl. Grant, 1967; Morris u. Ahmad, 1969). Auch bei *Chlorella vulgaris* blockiert DCMU die Nitritaufnahme im Licht nicht ganz. Da NH_3 ins Außenmedium abgeschieden wird, handelt es sich hierbei nicht um eine lichtabhängige Nitritaufnahme, sondern um eine echte Nitritreduktion. Die für diese durch DCMU nicht hemmbare "Restreduktion" benötigten Elektronendonatoren müssen also anderen Stoffwechselprozessen als der Photolyse des Wassers entstammen. Es wäre denkbar, daß aus endogenem Substrat H-Donatoren freigesetzt werden, die dann, eventuell mittels des Enzyms Hydrogenase, in die photosynthetische Elektronentransportkette unter Umgehung der Hemmstelle des DCMU eingeschleust werden. Jedoch blockiert DCMU sowohl bei Hydrogenase-haltigen (*Ankistrodesmus braunii*) als auch bei Hydrogenase-freien Algen (*Chlorella vulgaris*) die photosynthetische Reduktion von Nitrit nicht vollständig. Das Problem der "Restreduktion" ist somit noch ungelöst.

Eine weitere Substanz, die in den photosynthetischen Elektronentransport hemmend eingreift, ist das von Trebst u. Burba (1967) eingesetzte Disalicyliden-propandiamin-(1,3). Diese als DSPD bezeichnete Substanz verhindert die lichtabhängige Reduktion des Ferredoxins durch kompetitive Hemmung. Damit wird der Elektronentransport zwischen der Lichtreaktion I und dem Ferredoxin unterbrochen. Die genannten Autoren beschrieben eine Blockierung Ferredoxin-abhängiger photosynthetischer Reaktionen an isolierten Chloroplasten und intakten Zellen. Nicht Ferredoxin-abhängige Hill-Reaktionen bleiben durch DSPD jedoch unbeeinflusst.

Aus Abb. 20 geht hervor, daß bei *Ankistrodesmus* und *Chlorella* unter den angegebenen Versuchsbedingungen die photosynthetische Nitritreduktion durch DSPD stark blockiert wird, ebenso die lichtabhängige NH_3 -Assimilation. Dieser Befund widerspricht der von Trebst u. Burba (1967) gemachten Feststellung, daß die photosynthetische Reduktion von Nitrit bei *Chlorella* durch DSPD nicht behindert wird. Er bestätigt vielmehr die Beteiligung von Ferredoxin als Elektronendonator der photosynthetischen Nitritassimilation (Losada et al., 1963; Paneque et al., 1964).

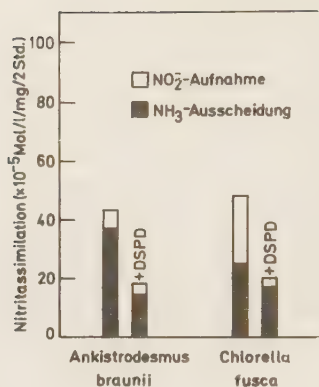


Abb. 20. Hemmung der anaeroben photosynthetischen Nitritassimilation durch DSPD bei *Ankistrodesmus braunii* und *Chlorella fusca*.

0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5. DSPD: 5×10^{-4} Mol/l.

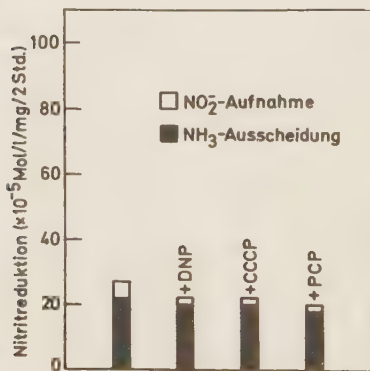


Abb. 21. Hemmung der anaeroben Dunkelreduktion von Nitrit mit H_2 durch DNP, CCCP und PCP.

Ankistrodesmus braunii. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5. 2 Std. Inkubation unter H_2 .

DNP: 10^{-4} Mol/l; CCCP: 10^{-5} Mol/l; PCP: 10^{-5} Mol/l.

III. Anaerobe Reduktion von Nitrit mit H_2 im Dunkeln.

Paneque et al. (1964) sowie Losada et al. (1963) schlugen als Elektronendonator für die Reduktion des Ferredoxins u. a. molekularen Wasserstoff vor, der durch das Enzym Hydrogenase aktiviert wird. Die unter diesen anaeroben Bedingungen im Dunkeln ablaufende Nitritreduktion hatte Kessler (1957 b) eingehend beschrieben. *Ankistrodesmus braunii* reduziert Nitrit unter Aufnahme stöchiometrischer Mengen von H_2 . In Abb. 21 ist diese anaerobe Dunkelreduktion dargestellt. Der als Nitrit aufgenommene Stickstoff wird in Form von NH_3 wieder ausgeschieden (vgl. Stiller, 1966).

Die anaerobe Dunkelreduktion von Nitrit unter H_2 wird durch Phosphorylierungsgifte nur wenig gehemmt. Kessler (1955, 1957 b) gab jedoch an, daß DNP die anaerobe Dunkelreduktion unter H_2 wie die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit stark blockiert. Eine deutliche Hemmung der Dunkelreduktion mit H_2 tritt jedoch erst bei älteren Algen auf, deren N-Versorgung nicht mehr optimal ist (Oosterheld, 1970). In diesem Falle wird auch kein NH_3 ausgeschieden; d. h. N-Mangelalgen assimilieren Nitrit vollständig (Abb. 22). Diese Dunkelassimilation unter H_2 ist durch Phosphorylierungsgifte hemmbar und offenbar ATP-abhängig. Bei jungen Kulturen ist dagegen die anaerobe Reduktion von Nitrit unter H_2 im Dunkeln weitgehend unabhängig vom ATP-Pool der Zellen.

Ahmad u. Morris (1968) versuchten, die DNP-Hemmung der H_2 -abhängigen Dunkelreduktion als Folge einer Konkurrenz zwischen Nitrit und DNP um den Wasserstoff zu erklären. DNP wird zwar unter einer H_2 -Atmosphäre reduziert, die durch diese Reaktion verursachte H_2 -Aufnahme entspricht aber nicht der durch DNP bewirkten Hemmung der Nitritreduktion mit H_2 im Dunkeln. Dieser Befund läßt die Möglichkeit offen, die DNP-Wirkung bei N-Mangelalgen als Folge einer Phosphorylierungshemmung zu deuten.

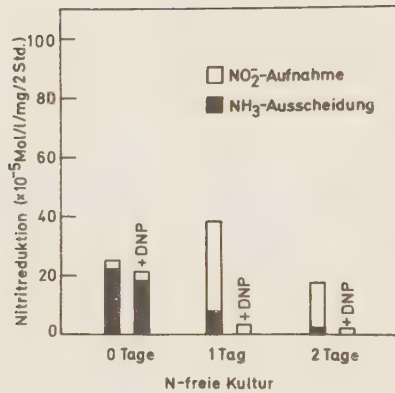


Abb. 22. Anaerobe Dunkelreduktion von Nitrit mit H_2 bei zunehmendem N-Mangel.

Ankistrodesmus braunii; 6 Tage Normalkultur, danach Kultur in N-freier Nährlösung.

0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5. 2 Std. Inkubation unter H_2 . DNP: 10^{-4} Mol/l .

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen sollten Aufschluß über die energetische Kopplung der Nitritassimilation an die ATP-liefernden Stoffwechselprozesse Atmung und Photosynthese geben. Die Blockierung der aeroben Dunkelassimilation durch Anaerobiose (Kessler, 1953) legt die Vermutung nahe, daß zur Assimilation des Nitrits energiereiches Phosphat benötigt wird. Die daraufhin von Kessler (1953, 1955, 1957 a) unternommenen Versuche zeigten, daß ATP zur Atmungs-abhängigen und photosynthetischen Nitritassimilation notwendig ist, denn das Phosphorylierungsgift DNP blockiert diese Vorgänge. Gegen diese Deutung der DNP-Wirkung erhoben sich jedoch Widersprüche (Nason u. Takahashi, 1958; Ramirez et al., 1966; Ahmad u. Morris, 1967). DNP sollte demnach als kompetitiver Hemmstoff die Nitritassimilation verringern, indem es dem Nitrit Elektronendonatoren entzieht. Mit dieser Ansicht konnte aber die Verminderung der Nitritassimilation durch Arsenat (Kessler u. Bucker, 1960) nicht erklärt werden. Unsere Befunde über eine Hemmbarkeit der Atmungs-abhängigen und photosynthetischen Nitritassimilation durch verschiedene Phosphorylierungsgifte zeigen erneut, daß die Assimilation von Nitrit von einem ausreichenden ATP-Pool der Zellen abhängig ist.

Diese Ansicht konnte durch weitere Befunde gestützt werden: Eine Verringerung des ATP-Pools der Zellen auf andere Weise als durch Vergiftung der Phosphorylierungen verursacht ebenfalls eine Beeinträchtigung der respiratorischen und photosynthetischen Nitritassimilation, wie sie in der hemmenden Wirkung von Phosphat (bei P-Mangelalgen) und Chlorid deutlich wird.

Die aerobe Dunkelreduktion von Nitrit führt zu einer vollständigen Assimilation des Stickstoffs. Es wird nur soviel Nitrit aufgenommen und reduziert, wie anschließend in einem Atmungs-abhängigen Prozeß assimiliert werden kann. Daher kommt es unter aeroben Verhältnissen zu keiner NH_3 -Ausscheidung. Unter Anaerobiose (N_2) dagegen ist die Nitritassimilation im Dunkeln stark vermindert, und das durch die Reduktion des Nitrits erzeugte NH_3 wird fast quantitativ ausgeschieden, so-

fern die Algen ausreichend ernährt worden sind.

Unsere Ergebnisse ließen vielleicht folgende Deutung des Assimilationsmechanismus zu: Nach Czygan (1965) wird Hydroxylamin, ein hypothetisches Zwischenprodukt der Reduktion des Nitrits, von intakten Algen nicht assimiliert. Daher schlägt Czygan einen Reduktions- und Assimilationsmechanismus vor, der als ersten Schritt die Bindung des Nitrits an organische Akzeptoren und in der Folge die Reduktion des gebundenen Nitrits umfaßt. Für diesen Assimilationsprozeß könnte ATP als Energielieferant notwendig sein.

Unter N_2 -Anaerobiose ist dieser Assimilationsweg wegen Mangels an ATP ausgeschlossen. Unter diesen Bedingungen wird Nitrit nicht in organische Bindung übergeführt. Es erfolgt dann offenbar eine schwache dissimilatorische Nitritreduktion, bei der Nitrit als Sauerstoffdonator zur Oxydation endogener Elektronendonatoren dient. Das Reduktionsprodukt NH_3 wird ausgeschieden. Naik u. Nicholas (1966) beschrieben entsprechende Verhältnisse für *Micrococcus denitrificans* und *Pseudomonas denitrificans*, bei denen Nitrat zur anaeroben Veratmung endogenen Substrats ($NADH_2$, Succinat) herangezogen wird. Die genannten Autoren weisen darauf hin, daß eventuell auch Nitrit dissimilatorisch reduziert werden kann.

Die anaerobe Dunkelreduktion mit H_2 ähnelt derjenigen unter N_2 -Anaerobiose. Als Reduktionsprodukt wird NH_3 ausgeschieden. Nitrit dient in diesem Falle als Elektronenakzeptor zur Oxydation des mittels Hydrogenase aktivierten Wasserstoffs (Kessler, 1957 b). Bei Normalalgen ist diese dissimilatorische Nitritreduktion anscheinend nur wenig durch Phosphorylierungsgifte hemmbar. Da zur Aktivierung des Enzyms Hydrogenase ATP benötigt wird (Oosterheld, 1970), könnte die geringe Hemmung der anaeroben Dunkelreduktion mit H_2 durch entkoppelnde Agentien in dieser Tatsache begründet sein. Bei an Stickstoff verarmten Algen liegen die Verhältnisse anders. Diese Algen assimilieren Nitrit auch unter H_2 -Atmosphäre vollständig in einer ATP-abhängigen Reaktion, wie die Hemmbarkeit durch DNP demonstriert (Abb. 22).

Für die photosynthetische Nitritassimilation wurde auf verschiedene Weise eine deutliche Abhängigkeit vom ATP-Pool der

Zellen nachgewiesen. Nitrit wird unter Beteiligung von ATP direkt mit Hilfe photosynthetischer Elektronendonatoren zu NH_3 reduziert. Aber nur ein Teil dieses Ammoniaks wird in einer ATP-abhängigen Reaktion assimiliert. Die Assimilation hängt außer vom ATP-Pool auch von photosynthetisch gebildeten Akzeptoren ab, wie die Förderung der NH_3 -Assimilation durch CO_2 zeigt (vgl. Bongers, 1956; Strotmann, 1967 b). Als organische Akzeptoren können auch Metabolisierungsprodukte der Glucose fungieren. Zunehmender N-Mangel erhöht ebenfalls die Assimilationsrate für NH_3 .

Unter aeroben Bedingungen sind die photosynthetische Nitritreduktion und die anschließende lichtabhängige NH_3 -Assimilation höher als unter N_2 , denn die auch bei Belichtung ablaufende oxydative Phosphorylierung vergrößert den ATP-Pool (Strotmann, 1967 b). Außerdem entsteht durch die Atmungsvorgänge CO_2 , das in die Photosynthese eintreten kann und damit den Pool an organischen NH_3 -Akzeptoren erhöht.

Inhibitoren, welche die Photosynthese blockieren, hemmen auch die lichtabhängige Nitritassimilation, deren Elektronendonatoren photosynthetischen Primärprozessen entstammen. So verringert DSPD die photosynthetische Assimilation von Nitrit beträchtlich durch Erniedrigung der Ferredoxinreduktion (Trebst u. Burba, 1967). Ferredoxin ist als Elektronendonator der Nitritreduktion in vitro nachgewiesen (Losada et al., 1963; Hattori u. Myers, 1966; Ramirez et al., 1966). Auch DCMU, ein äußerst wirksamer Hemmstoff photosynthetischer Primärprozesse, setzt die lichtabhängige Nitritassimilation sehr stark herab. Obwohl die Photolyse des Wassers unterbunden (Bishop, 1958) und in der Folge die Reduktion des Ferredoxins anscheinend verhindert wird, findet dennoch eine gewisse "Restreduktion" von Nitrit statt (vgl. Grant, 1967; Morris u. Ahmad, 1969). Wahrscheinlich werden dann nicht-photosynthetische endogene Elektronendonatoren zur Reduktion des Ferredoxins und damit des Nitrits herangezogen. Das Wasserstoff aktivierende Enzym Hydrogenase ist jedenfalls für diese Reaktion nicht notwendig.

Die dargestellten Ergebnisse lassen wohl keinen Zweifel daran, daß energiereiches Phosphat für die Nitritassimilation benötigt wird. Bei Versuchen in vitro hatte sich aber

gezeigt, daß Nitrit ohne Beteiligung von ATP zu NH_3 reduziert wird (vgl. Ramirez et al., 1966). Zur Erklärung dieses Widerspruchs sind mehrere Möglichkeiten denkbar (vgl. Kessler et al., 1970):

1. Die in vitro untersuchte Nitritreduktase ist verschieden von der Reduktase, die in vivo Nitrit reduziert.
2. Die Reduktion von Nitrit in vivo erfolgt nach einer ATP-abhängigen Bindung des Nitrits an organische Akzeptoren (vgl. Czygan, 1965).
3. Die Nitritreduktase ist in den Chloroplasten lokalisiert (Ritenour et al., 1967). Der Transport des von außen zugeführten oder durch Nitratreduktion im Cytoplasma entstandenen Nitrits an den Reduktionsort erfordert energiereiches Phosphat.

Welche der angesprochenen Möglichkeiten der ATP-Wirkung auf die Atmungs-abhängige und photosynthetische Nitritassimilation am nächsten kommt, müssen zukünftige Untersuchungen erweisen.

Zusammenfassung

1. Die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit bei der Grünalge *Ankistrodesmus braunii* wird durch die Phosphorylierungsgifte 2,4-Dinitrophenol (DNP), Arsenat, Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) und Pentachlorphenol (PCP) spezifisch gehemmt. In nitrathaltigem Medium bewirken diese Stoffwechselgifte eine starke Ausscheidung von Nitrit. Arsenat, CCCP und PCP beeinträchtigen jedoch die Nitritreduktion *in vitro* nicht. Die ATP-abhängige Aufnahme von Chlorid und von Phosphat (bei P-Mangelalgen) setzt die aerobe Dunkelassimilation von Nitrit herab.

2. Bei Belichtung ist die Reduktion von Nitrit deutlich erhöht. Das Reduktionsprodukt Ammoniak wird teilweise assimiliert und teilweise ausgeschieden. DNP, Arsenat, CCCP und PCP hemmen die photosynthetische Nitritassimilation unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Chlorid und Phosphat (bei P-Mangelalgen) verringern die photosynthetische Nitritassimilation, CO_2 erhöht sie. Auch bei völliger Blockierung des Lichtsystems II durch 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) wird Nitrit im Licht zu NH_3 reduziert. Disalicyliden-propandiamin-(1,3), ein kompetitiver Hemmstoff der photosynthetischen Reduktion des Ferredoxins und der zyklischen Photophosphorylierung, blockiert die lichtabhängige Nitritassimilation.

3. Die anaerobe Dunkelassimilation von Nitrit mit H_2 wird durch DNP, Arsenat, CCCP und PCP nur wenig gehemmt. Das Reduktionsprodukt NH_3 wird ausgeschieden. Bei leichtem N-Mangel wird NH_3 dagegen assimiliert. Die Hemmung dieser Nitritassimilation durch die Phosphorylierungsgifte wird mit zunehmendem N-Mangel stärker.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß energiereiches Phosphat für die Nitritassimilation notwendig ist.

Literatur

- Ahmad, J., Morris, I.: Inhibition of nitrate and nitrite reduction by 2,4-dinitrophenol in *Ankistrodesmus*. Arch. Mikrobiol. 56, 219 - 224 (1967).
- Ahmad, J., Morris, I.: The effects of 2,4-dinitrophenol and other uncoupling agents on the assimilation of nitrate and nitrite by *Chlorella*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 162, 32 - 38 (1968).
- Arnon, D. I., Tsujimoto, H. Y., McSwain, B. D.: Ferredoxin and photosynthetic phosphorylation. Nature 214, 562 - 566 (1967).
- Barber, J.: Light induced uptake of potassium and chloride by *Chlorella pyrenoidosa*. Nature 217, 876 - 878 (1968 a).
- Barber, J.: The influx of potassium into *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 163, 141 - 149 (1968 b).
- Barber, D. A., Koontz, H. V.: Uptake of dinitrophenol and its effect on transpiration and calcium accumulation in barley seedlings. Plant Physiol. 38, 60 - 65 (1963).
- Beevers, L., Hageman, R. H.: Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 495 - 522 (1969).
- Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücken, T., Czock, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Diphosphofructo-Al-dolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8 b, 555 - 577 (1953).
- Bishop, N. I.: The influence of the herbicide, DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 27, 205 - 206 (1958).
- Bishop, N. I., Gaffron, H.: On the interrelation of the mechanisms for oxygen and hydrogen evolution in adapted algae. p. 441 - 451 in: Photosynthetic mechanisms of green plants. Natl. Acad. Sci., Natl. Res. Council., Washington (1963).
- Blond, D. M., Whittam, R.: Effects of Na and K on oxidative phosphorylation in relation to respiratory control by a cell-membrane ATP-ase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 120 - 124 (1964).

- Bongers, L. H. J.: Aspects of nitrogen assimilation by cultures of green algae. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 56, 1 - 52 (1956).
- Bonner J., Millerd, A.: Oxydative phosphorylation by plant mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 42, 135 - 148 (1953).
- Braunstein, A. E.: Über den Einfluß von Arsenat auf Phosphatumsatz und Glykolyse im Blut. Biochem. Z. 240, 68 - 93 (1931).
- Crane, R. K., Lipmann, F.: The effect of arsenate on aerobic phosphorylation. J. biol. Chem. 201, 235 - 243 (1953).
- Czygan, F.-C.: Zur Frage der Zwischenprodukte der Nitratreduktion bei Grünalgen. Planta (Berl.) 64, 301 - 311 (1965).
- Del Campo, F. F., Ramirez, J. M., Paneque, A., Losada, M.: Ferredoxin and the dark and light reduction of dinitrophenol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 547 - 553 (1966).
- Grant, B. R.: The action of light on nitrate and nitrite assimilation by the marine chlorophyte, *Dunaliella tertiolecta* (Butcher). J. gen. Microbiol. 48, 379 - 389 (1967).
- Hattori, A.: Light-induced reduction of nitrate, nitrite, and hydroxylamine in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. Plant and Cell Physiol. 3, 355 - 369 (1962).
- Hattori, A., Myers, J.: Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to ammonia. Plant Physiol. 41, 1031 - 1036 (1966).
- Hewitt, E. J., Nicholas D. J. D.: Enzymes of inorganic nitrogen metabolism. p. 67 - 172 in: K. Paech u. M. V. Tracey (Eds.), Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 7. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964).
- Heytler, P. G.: Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. I. Some characteristics of m-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. Biochemistry 2, 357 - 361 (1963).
- Heytler, P. G., Prichard, W. W.: A new class of uncoupling agents - carbonyl cyanide phenylhydrazones. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 272 - 275 (1962).

- Jeschke, W. D.: Die cyclische und die nichtcyclische Photo-phosphorylierung als Energiequellen der lichtabhängigen Chloridionenaufnahme bei Elodea. *Planta* (Berl.) 73, 161 - 174 (1967).
- Joy, K. W., Hageman, R. H.: The purification and properties of nitrite reductase from higher plants, and its dependence on ferredoxin. *Biochem. J.* 100, 263 - 273 (1966).
- Kandler, O.: The effect of 2,4-dinitrophenol on respiration, oxydative assimilation, and photosynthesis in Chlorella. *Physiol. Plantarum* 11, 675 - 684 (1958).
- Kessler, E.: Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen. I. Nitritbildung und Nitritreduktion durch Anki-strodesmus braunii (Nägeli) Brunnthaler. *Flora* (Jena) 140, 1 - 38 (1953).
- Kessler, E.: Über die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf Nitratreduktion und Atmung von Grünalgen. *Planta* (Berl.) 45, 94 - 105 (1955).
- Kessler, E.: Untersuchungen zum Problem der photochemischen Nitratreduktion in Grünalgen. *Planta* (Berl.) 49, 505 - 523 (1957 a).
- Kessler, E.: Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hydrogenase enthaltenden Grünalgen. II. Dunkelreduktion von Nitrat ^{und} ~~zu~~ Nitrit mit molekularem Wasserstoff. *Arch. Mikrobiol.* 27, 166 - 181 (1957 b).
- Kessler, E.: Nitrate assimilation by plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 15, 57 - 72 (1964).
- Kessler, E., Bucker, W.: Über die Wirkung von Arsenat auf Nitratreduktion, Atmung und Photosynthese von Grünalgen. *Planta* (Berl.) 55, 512 - 524 (1960).
- Kessler, E., Czygan, F.-C.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen. *Arch. Mikrobiol.* 70, 211 - 216 (1970).
- Kessler, E., Hofmann, A., Zumft, W. G.: Inhibition of nitrite assimilation by uncouplers of phosphorylation. *Arch. Mikrobiol.* 72, 23 - 26 (1970).

- Krogmann, D. W., Jagendorf, A. T., Avron, M.: Uncouplers of spinach chloroplast photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol.* 34, 272 - 277 (1959).
- Kylin, A.: Ion transport in P-deficient *Scenedesmus* upon readitions of phosphate in light and darkness. I. Uptake and loss of Cl^- , and measurements of oxygen consumption. *Z. Pflanzenphysiol.* 56, 70 - 80 (1967).
- Kylin, A., Tillberg J.-E.: The relation between total photophosphorylation, level of ATP, and oxygen evolution in *Scenedesmus* as studied with DCMU and Antimycin A. *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 165 - 174 (1967).
- Latzko, E., Claus, D.: Aerobe Phosphorylierung unter dem Einfluß von K^+ , Na^+ , Rb^+ und NH_4^+ . *Naturwissenschaften* 45, 59 - 60 (1958).
- Loomis, W. F., Lipmann, F.: Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. *J. biol. Chem.* 173, 807 - 808 (1948).
- Losada, M., Paneque, A., Ramirez, J. M., Del Campo, F. F.: Mechanism of nitrite reduction in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10, 298 - 303 (1963).
- MacRobbie, E. A. C.: The nature of the coupling between light energy and active ion transport in *Nitella translucens*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 94, 63 - 73 (1965).
- Mechsner, K.: Untersuchungen an *Chlorella vulgaris* über den Einfluß der Alkaliionen auf die Lichtphosphorylierung. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 33, 150 - 158 (1959).
- Morris, I., Ahmad, J.: The effect of light on nitrate and nitrite assimilation by *Chlorella* and *Ankistrodesmus*. *Physiol. Plantarum* 22, 1166 - 1174 (1969).
- Morris, I., Syrett, P. I.: The effect of nitrogen starvation on the activity of nitrate reductase and other enzymes in *Chlorella*. *J. gen. Microbiol.* 38, 21 - 28 (1965).
- Naik, M. S., Nicholas, D. J. D.: Phosphorylation associated with nitrate and nitrite reduction in *Micrococcus denitrificans* and *Pseudomonas denitrificans*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 113, 490 - 497 (1966).

- Nason, A., Takahashi, H.: Inorganic nitrogen metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 12, 203 - 246 (1958).
- Neumann, J., Jagendorf, A. T.: Dinitrophenol as an uncoupler of photosynthetic phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 562 - 567 (1964).
- Nitsos, R. E., Evans, H. J.: Effects of univalent cations on the inductive formation of nitrate reductase. *Plant Physiol.* 41, 1499 - 1504 (1966).
- Oesterheld, H.: Das Verhalten von Nitratreductase, Nitritreductase Hydrogenase und anderen Enzymen von *Ankistrodesmus braunii* bei Stickstoffmangel. (Im Druck).
- Paneque, A., Ramirez, J. M., Del Campo, F. F., Losada, M.: Light and dark reduction of nitrite in a reconstituted enzymatic system. *J. biol. Chem.* 239, 1737 - 1741 (1964).
- Pirson, A.: Functional aspects in mineral nutrition of green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6, 71 - 114 (1955).
- Pirson, A., Tichy, C., Wilhelmi, G.: Stoffwechsel und Mineral-salzernährung einzelliger Grünalgen. I. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von *Ankistrodesmus*. *Planta (Berl.)* 40, 199 - 253 (1952).
- Ramirez, J. M., Del Campo, F. F., Paneque, A., Losada, M.: Ferredoxin-nitrite reductase from spinach. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 118, 58 - 71 (1966).
- Ritenour, G. L., Joy, K. W., Bunning, J., Hageman, R. H.: Intracellular localization of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamic acid dehydrogenase in green leaf tissue. *Plant Physiol.* 42, 233 - 237 (1967).
- Simonis, W., Urbach, W.: Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. VIII. Über den Einfluß von 2,4-Dinitrophenol bei *Ankistrodesmus braunii*. *Z. Naturforsch.* 15 b, 816 - 817 (1960).
- Stenlid, G.: The effect of 2,4-dinitrophenol upon oxygen consumption and glucose uptake in young wheat roots. *Physiol. Plantarum* 2, 350 - 371 (1949).

- Stiller, M.: Hydrogenase mediated nitrite reduction in *Chlorella*. *Plant Physiol.* 41, 348 - 352 (1966).
- Strotmann, H.: Kinetik der photosynthetischen Nitritreduktion in vivo. *Ber. Dt. Bot. Ges.* 79, (118). - (120) (1966).
- Strotmann, H.: Blaulichteffekt auf die Nitritreduktion von *Chlorella*. *Planta (Berl.)* 73, 376 - 380 (1967 a).
- Strotmann, H.: Untersuchungen zur lichtabhängigen Nitritreduktion von *Chlorella*. *Planta (Berl.)* 77, 32 - 48 (1967 b)
- Tanner, W., Kandler, O.: Die Abhängigkeit der Adaptation der Glucose-Aufnahme von der oxydativen und der photosynthetischen Phosphorylierung bei *Chlorella vulgaris*. *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 24 - 32 (1967).
- Trebst, A., Burba, M.: Über die Hemmung photosynthetischer Reaktionen in isolierten Chloroplasten und in *Chlorella* durch Disalicyliden-propandiamin. *Z. Pflanzenphysiol.* 57, 419 - 433 (1967).
- Weinbach, E. C.: The effect of pentachlorophenol on oxidative phosphorylation. *J. biol. Chem.* 210, 545 - 550 (1954).
- Wessels, J. S. C.: The action of some derivatives of phenyl-urethane and of 3-phenyl-1,1-dimethyl-urea on the Hill-reaction. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 19, 548 - 549 (1956).
- Wessels, J. S. C.: Dinitrophenol as a catalyst of photosynthetic phosphorylation. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 36, 264 - 265 (1959).
- Wessels, J. S. C.: Mechanism of the reduction of organic nitro compounds by chloroplasts. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 109, 357 - 371 (1965).

Danksagung

Herrn Professor Dr. E. Kessler danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die anregenden Diskussionen, die mir die Anfertigung dieser Arbeit wesentlich erleichtert haben.

Ebenso gilt mein Dank den Kollegen im Botanischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, mit denen ich über verschiedene Fragen diskutieren konnte.

Der Stiftung Volkswagenwerk danke ich für die Gewährung eines großzügigen Stipendiums.

Lebenslauf

Am 28. Oktober 1940 wurde ich als Sohn des Bahnarbeiters Anton Hermann Hofmann und seiner Frau Maria, geb. Track, in Turn, Kreis Teplitz-Schönau, geboren. Im Juni 1946 übersiedelte ich mit meiner Familie nach Stadtilm in Thüringen. Dort besuchte ich vom September 1947 bis zum Juli 1955 die Grundschule. Von September 1955 bis Juli 1956 war ich Schüler der Oberschule in Arnstadt/Thüringen. Im August 1956 zog ich nach Uehlfeld in Mittelfranken und besuchte im Schuljahr 1956/1957 das Spätkberufenseminar der Karmeliten in Bamberg. Im Gymnasium mit Oberrealschule in Neustadt/Aisch wurde ich vom September 1957 bis zum Abitur im Juli 1961 unterrichtet. Vom WS 1961/62 an studierte ich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg Chemie, Biologie und Geographie. Dieses Studium schloß ich im Juni 1967 mit der Wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie ab. Die Erweiterungsprüfung in Geographie bestand ich im Juni 1968.

Von Dezember 1967 bis Dezember 1969 arbeitete ich am Botanischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Kessler an meiner Dissertation. Seit Februar 1970 bin ich Studienreferendar am Pädagogischen Seminar des Ohm-Gymnasiums in Erlangen.

Am 8. April 1969 heiratete ich Frl. Hannelore Bock. Unser Wohnort ist seit Dezember 1969 Straubing.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
